

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico

Lic. Carlos M. Fernández Andreu,<sup>1</sup> Lic. Mario González Miranda,<sup>2</sup> Dra. María Teresa Illnait Zaragoza<sup>3</sup> y Dr. Gerardo Martínez Machín<sup>4</sup>

### RESUMEN

Con el objetivo de conocer la sensibilidad frente a la anfotericina B, principal fármaco para el tratamiento de las micosis sistémicas, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) en 90 aislamientos clínicos de *Candida* y *Cryptococcus* mediante un micrométodo de dilución en caldo casitona. Los resultados permiten concluir que *Cryptococcus neoformans* fue más sensible que *Candida albicans* (medias geométricas 0,24 y 0,41 respectivamente). Sólo fue encontrada una cepa resistente (CMI= 16 µg/mL), perteneciente a la especie *Candida krusei*. La implantación de esta técnica en el Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" permitirá establecer los patrones de sensibilidad y detectar la posible aparición de resistencia en las principales especies de hongos patógenos para el hombre en nuestro medio.

**Descriptores DeCS:** ANFOTERICINA B/análisis; TESTS DE SENSIBILIDAD MICROBIANA/métodos; CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/aislamiento & purificación; CANDIDA ALBICANS/aislamiento & purificación; CANDIDA/aislamiento & purificación; MEDIOS DE CULTIVO.

Las infecciones fúngicas oportunistas han llegado a ser una importante causa de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados. La mayor parte del aumento de estas infecciones se puede atribuir al incremento del uso de nuevos y más efectivos agentes antibacterianos, trasplantes de órganos, terapias inmunosupresoras y citostáticas, y fundamentalmente a la emergencia de la gran pandemia del siglo, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Por otro lado, la aparición de cepas resistentes a los diferentes antifúngicos usados en la terapia se reporta como un problema en aumento.<sup>1-5</sup>

Otro elemento nuevo que se debe tener en cuenta en la situación actual de las micosis es la apari-

ción de los llamados hongos patógenos emergentes, entre los que se pueden mencionar especies del género *Candida*, tales como *Candida pelliculosa*, *Candida lipolytica*, *Candida lusitane*, *Candida famata* y *Candida ciferrii*, entre otras, cuya sensibilidad a los antifúngicos generalmente no se conoce.<sup>3,5-9</sup>

Los laboratorios de micología desempeñan una función cada día más importante en el control y tratamiento de estas infecciones, y resulta necesario llegar a una estandarización de los procedimientos que nos proporcionen resultados precisos, confiables y reproducibles, con el objetivo de conocer la actividad de los antifúngicos, cuyo número crece de for-

<sup>1</sup> Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

<sup>2</sup> Licenciado en Microbiología.

<sup>3</sup> Especialista de I Grado en Microbiología.

<sup>4</sup> Especialista de I Grado en Microbiología. Investigador Agregado.

ma rápida, y el estado de resistencia de las especies implicadas. En este sentido, las pruebas de sensibilidad *in vitro* pueden ser de gran ayuda para el seguimiento y monitoreo de la terapia. Sin embargo, estos estudios carecen de la reproducibilidad y de la correlación de la eficacia *in vivo* deseados, y aunque se han hecho numerosos intentos de estandarización de estas pruebas, no se ha llegado a una aprobación unánime. Una de las propuestas que más éxito ha tenido es la realizada por el Comité Nacional para los Estándares de Laboratorio Clínico de los EE.UU., conocida internacionalmente como NCCLS M27-P.<sup>10</sup>

En nuestro país, estos estudios no se realizan de forma habitual en los laboratorios de microbiología médica. Teniendo en cuenta la importancia que se le confiere al nivel mundial a los estudios de sensibilidad *in vitro* de los antifúngicos y a la necesidad de poder contar con una técnica factible y adecuada a nuestras condiciones, hemos considerado apropiado, mediante un micrométodo de dilución en caldo casitona, determinar la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en cepas de levaduras pertenecientes a los 2 géneros de mayor importancia médica: *Candida* y *Cryptococcus*.

## MÉTODOS

Se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de anfotericina B a cepas de levaduras aisladas de muestras clínicas, de acuerdo con la metodología empleada en el Instituto "Pasteur" de París.<sup>11</sup> Fueron estudiadas 90 cepas identificadas según las normas establecidas en el Laboratorio de Micología y pertenecientes a las siguientes especies: *Cryptococcus neoformans*, 43 cepas; *Candida albicans*, 39; *Candida tropicalis*, 3; *Candida krusei*, 3; *Candida glabrata*, 1; *Candida guilliermondii*, 1.

Como controles fueron utilizadas las cepas *C. tropicalis* CTR2 (resistente) y *C. albicans* 3153A (sensible) procedentes del Instituto "Pasteur" de París.

**Antifúngico y solvente.** La anfotericina B (Squibb) fue disuelta en dimetilsulfóxido a una concentración de 2mg/mL. A partir de esta solución "madre" se preparó una dilución de 1 280 µg/mL con agua destilada y se esterilizó por filtración (0,22µm).<sup>12</sup>

**Medio de cultivo.** Se utilizó el medio de casitona (Bacto-casitone Difco: 0,9 %, glucosa 2 %; extracto de levadura 0,5 %; fosfato dibásico de sodio 0,1 %; fosfato monobásico de sodio 0,1 % y citrato trisódico 1 %; pH 6,6).<sup>11</sup>

**Inóculo.** A partir de cultivos de 48 h en agar Sabouraud-cloranfenicol de cada una de las cepas, se preparó una suspensión y se ajustó la concentración hasta obtener una densidad equivalente al 0,5 de la escala de Mac Farland (1x 10<sup>6</sup> células/mL en cámara de Neubauer). De esta suspensión se tomaron 50 µL y se añadieron a tubos con 5 mL de medio de casitona, se obtuvo una concentración de 1x10<sup>4</sup> células/mL.<sup>10,11,13,14</sup>

**Técnica empleada y lectura.** Se emplearon placas estériles de poliestireno para microtitulación de 96 pocillos con fondo redondo. Fueron repartidos 20 µL de agua destilada estéril en cada pocillo hasta completar las 12 columnas. Se tomaron 20 µL de la solución a 1 280 µg/mL y a partir de la columna 2 se hicieron diluciones dobles seriadas hasta la columna 11.

De la suspensión de inóculo preparada, se distribuyeron 180 µL por pocillo desde la columna 2 hasta la 12, esto se realizó por duplicado para cada cepa. La concentración final del microorganismo en cada pocillo fue de 9 x 10<sup>3</sup> células/mL. La gama final de concentraciones del antifúngico después de añadido el inóculo estuvo entre 64 (columna 2) y 0,125 µg/mL (columna 11).

En la columna 1 se distribuyeron 180 µL del medio de cultivo sin inocular y quedó como control negativo de crecimiento. En la columna 12 no se adicionó antifúngico y quedó como control positivo de reproducibilidad interna. El volumen total en cada pocillo fue de 200 µL.

Las placas fueron incubadas en cámara húmeda a 35 °C durante 72 h. Las lecturas se realizaron a las 24, 48 y 72 h de incubación mediante la ayuda de un visor de aumento.

**Determinación del punto final.** La CMI se definió como la menor concentración de antifúngico frente a la cual las levaduras ensayadas no exhibieron crecimiento visible. El criterio de crecimiento fue una turbidez definida o un solo botón sedimentado. En la determinación del punto final, se consideró el desarrollo o su falta en el pocillo en estudio en comparación con las características de crecimiento

en el pocillo control de la columna 12.<sup>13-15</sup> Además, se determinó la CMI a los diferentes tiempos de lecturas según reportan algunos autores.<sup>16,17</sup>

**Análisis estadístico.** Se determinaron los rangos y las medias geométricas de los valores de CMI obtenidos. Fue utilizada la prueba U de Mann-Whitney como prueba no paramétrica para la comparación de los valores de CMI de las cepas de *C. albicans* y *C. neoformans*.

Además, se determinaron los porcentajes acumulativos de CMI para *C. albicans* y *C. neoformans* y se obtuvieron las CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> (concentración mínima inhibitoria del 50 y 90 % de las cepas, respectivamente).

## RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran de forma comparativa los valores de rangos y medias geométricas (MG) obtenidos para las especies estudiadas, según la lectura realizada en comparación con el control de crecimiento. Aunque presentan el mismo rango, las MG de *C. albicans* y *C. neoformans* difieren de forma significativa ( $p < 0,05$ ). De las demás especies estudiadas, aunque el número de cepas fue limitado, se observó que la MG de *C. tropicalis* fue ligeramente superior a la de *C. albicans*; mientras que la especie *C. krusei* mostró los valores promedios más elevados, debido especialmente a una de las cepas, cuyo valor de CMI fue de 16  $\mu\text{g/mL}$ .

**TABLA 1.** Rangos y medias geométricas (MG) de los valores de concentración mínima inhibitoria ( $\mu\text{g/mL}$ ) para las distintas especies en comparación con el control de crecimiento

Especies(n)	Rango	MG
<i>Cryptococcus neoformans</i> (43)	$\leq 0,125-2$	0,24*
<i>Candida albicans</i> (39)	$\leq 0,125-2$	0,41*
<i>Candida tropicalis</i> (3)	0,5	0,50
<i>Candida krusei</i> (3)	0,25-16	1,00
<i>Candida guilliermondii</i> (1)	$\leq 0,125$	-
<i>Candida glabrata</i> (1)	$\leq 0,125$	-

\* Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

La cantidad de cepas inhibidas de *C. albicans* y *C. neoformans* con las diferentes concentraciones y sus diferentes porcentajes acumulativos son mostrados en la tabla 2; el mayor porcentaje de cepas de *C. neoformans* presentó valores de CMI iguales o me-

nores que 0,125  $\mu\text{g/mL}$  y se observa que este porcentaje va decreciendo a medida que aumenta la concentración de la droga. Para *C. albicans* la concentración de 0,25  $\mu\text{g/mL}$  fue la que inhibió a una mayor cantidad de cepas (33,3 %).

**TABLA 2.** Número de cepas inhibidas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* y porcentajes acumulativos para las distintas concentraciones empleadas de anfotericina B

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>Candida albicans</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>	
	No. de cepas inhibidas (%)	Porcentajes acumulativos	No. de cepas inhibidas (%)	Porcentajes acumulativos
0,125	6 (15,4)	15,4	19 (44,2)	44,2
0,25	13 (33,3)	48,7	13 (30,2)	74,4
0,5	10 (25,6)	74,4	7 (16,3)	90,7
1	6 (15,4)	90,0	2 (4,7)	95,3
2	4 (10,3)	100,0	2 (4,7)	100,0

Para *C. albicans*, la CMI<sub>50</sub> fue de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  mientras que la CMI<sub>90</sub> fue de 1. Tanto la CMI<sub>50</sub> como la CMI<sub>90</sub> para *C. neoformans* fueron más bajas que para *C. albicans* (0,25 y 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ; respectivamente). En ambas especies fue necesaria una concentración de 2  $\mu\text{g/mL}$  para inhibir el crecimiento del 100 % de las cepas.

En ninguna de las especies estudiadas se encontraron valores de CMI superiores a 2  $\mu\text{g/mL}$ , excepto en la cepa de *C. krusei* antes referida. Los controles utilizados se comportaron de manera estable con valores de CMI de 32  $\mu\text{g/mL}$  para la cepa resistente y 0,25  $\mu\text{g/mL}$  para la sensible.

La tabla 3 se confeccionó a partir de los resultados obtenidos según el criterio de lectura en 3 momentos fijos (24, 48 y 72 h). A las 24 h, 20 cepas de *C. neoformans* (46,5 %) y 2 de *C. albicans* (51 %) no habían crecido. De igual forma, la cepa de *C. krusei* que mostró un alto valor de CMI (16  $\mu\text{g/mL}$ ) tuvo un crecimiento más lento que las demás cepas de esta misma especie y a las 24 h tampoco había mostrado crecimiento visible. Se observa, además, cómo los valores de la MG para cada especie se incrementan en el tiempo, *C. krusei* es la especie con valores más altos a partir de las 48 h.

*C. guilliermondii* y *C. glabrata* tuvieron una sensibilidad estable; todas las demás especies ampliaron sus rangos de CMI con el tiempo. Para *C. albicans* y *C. neoformans* éstos se mantuvieron estables entre las 48 y las 72 h, no así en *C. krusei* y *C. tropicalis* donde el aumento es apreciable.

**TABLA 3.** Rangos y medias geométricas (MG) de los valores de concentración mínima inhibidora ( $\mu\text{g/mL}$ ) en los diferentes tiempos de lectura

Especies(n)	24 h		48 h		72 h	
	Rango	MG	Rango	MG	Rango	MG
<i>Cryptococcus neoformans</i> (43)	$\leq 0,125$ -2	0,28*	$\leq 0,125$ -4	0,31	$\leq 0,125$ -4	0,36
<i>Candida albicans</i> (39)	$\leq 0,125$ -2	0,41**	$\leq 0,125$ -4	0,75	$\leq 0,125$ -4	1,02
<i>Candida tropicalis</i> (3)	0,5	0,50	1-2	1,60	2-4	2,52
<i>Candida krusei</i> (3)	0,25	0,25***	0,5-16	2,00	1-32	4,00
<i>Candida guilliermondii</i> (1)	$\leq 0,125$	-	$\leq 0,125$	-	$\leq 0,125$	-
<i>Candida glabrata</i> (1)	$\leq 0,125$	-	$\leq 0,125$	-	$\leq 0,125$	-
Control sensible	0,25	-	0,5	-	1	-
Control resistente	-	-	32	-	64	-

\* n = 23

\*\* n = 37

\*\*\* n = 2

## DISCUSIÓN

La falta de estandarización de las pruebas de sensibilidad *in vitro* ha dado lugar a una gran variabilidad de los resultados obtenidos por los distintos laboratorios (o incluso dentro de un mismo laboratorio) y su comparación se convierte en una tarea realmente difícil y a veces imposible de llevar a cabo.<sup>10,11,15,16</sup> La propuesta de estandarización realizada por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico de los EE.UU., conocida como NCCLS M27-P, aún no ha contado con una aprobación generalizada y ha sido objeto de sugerencias de modificaciones en varios parámetros. Según esta propuesta, el medio recomendado es el RPMI 1640, sin embargo, ha sido señalado el efecto inhibitorio que ejerce dicho medio sobre el crecimiento de algunas cepas de *C. neoformans*<sup>10,18</sup>

En las pruebas de sensibilidad con anfotericina B, un factor fundamental que influye en los resultados es la composición del medio de cultivo. No es recomendable que contenga esteroides tales como colesterol o ergosterol debido a que estos componentes pudieran interferir con el mecanismo de acción de este antifúngico.<sup>19</sup> El medio de cultivo utilizado por nosotros fue el de casitona líquido, que ha sido empleado con buenos resultados y recomendado por diferentes autores en estudios similares.<sup>11,20</sup>

En un estudio realizado por Arias y otros en 1992, la MG obtenida para los valores de CMI en *C. parapsilosis* frente a anfotericina B fue de 0,43  $\mu\text{g/mL}$ , dentro de un rango de  $\leq 0,05$ -1,56  $\mu\text{g/mL}$ , es decir, el 100 % de las cepas fueron sensibles.<sup>13</sup>

Arévalo y otros, en 1994, determinaron la sensibilidad *in vitro* de *Candida spp.* frente a la anfotericina B mediante un micrométodo en medio *Yeast Nitrogen Base* y encontraron que, entre las 7 especies diferentes a *C. albicans* estudiadas, *C. glabrata* fue la que necesitó mayores concentraciones del antifúngico para su total inhibición (2,9 % de las cepas fueron resistentes), mientras que *C. krusei* y *C. tropicalis* requerían concentraciones de 3,125  $\mu\text{g/mL}$  para el 100 % de inhibición y eran también las especies con más altas MG (0,68 y 0,51; respectivamente), superiores a las obtenidas en el presente trabajo.<sup>14</sup>

En un estudio colaborativo realizado por Barchiesi y otros en 1994, con el medio RPMI 1640, el rango encontrado para *C. albicans* fue de 0,25-1,0  $\mu\text{g/mL}$ , es decir, más estrecho que el encontrado por nosotros. Sin embargo, ellos encuentran valores más altos para *C. tropicalis* (0,25-2,0  $\mu\text{g/mL}$ ).<sup>15</sup> Hernández Molina y otros mediante el método de dilución en agar (*Yeast Morphology Agar*), habían reportado un rango de 0,12-0,5  $\mu\text{g/mL}$  entre 106 cepas de *C. albicans* y de 0,5-1,0  $\mu\text{g/mL}$  entre 19 de *C. tropicalis*, mientras que *C. krusei* (9 cepas) mostró un rango de 1,0-2,0  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>12</sup>

Los estudios para conocer la sensibilidad de *C. neoformans* han sido escasos.<sup>15-17</sup> Según Barchiesi y otros, esta especie se muestra más sensible a la anfotericina B que *Candida spp.*, con un rango de 0,06-1,0  $\mu\text{g/mL}$ ; en nuestro estudio, esta especie se mostró también más sensible que las especies de *Candida*, aunque con un rango de  $\pm 0,125$ -2,0  $\mu\text{g/mL}$ . Casadeval y otros habían obtenido en

un estudio de 13 cepas de *C. neoformans*, un rango  $\pm$  0,14-0,29  $\mu\text{g/mL}$ , lo que de manera general indica la alta sensibilidad de esta especie a la droga. La literatura médica revisada reporta solo 1 caso bien documentado de un aislamiento de *C. neoformans* resistente a la anfotericina B.<sup>17</sup>

Aunque escasos, existen en la literatura médica reportes de resistencia a la anfotericina B en cepas de levaduras de los géneros *Candida* y *Cryptococcus*.<sup>3,4,9,17</sup> Odds en 1988, ha definido a una cepa como resistente a la anfotericina B cuando su CMI es superior a 4  $\mu\text{g/mL}$ ;<sup>3</sup> este criterio, aunque es compartido por otros autores, no es aceptado por todos.<sup>13,14</sup> Según Meyer, y Vanden Bossche y otros, este valor debe ser mayor o igual que 2  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que Conly y otros señalan que debe ser de 0,8  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>4,5,21</sup>

La resistencia o la sensibilidad moderada a la anfotericina B se ha observado con mayor frecuencia en especies del género *Candida* diferentes a *C. albicans*, sobre todo en *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. lipolytica* y *C. krusei*.<sup>3-5</sup> aunque los criterios de resistencia han sido diversos.

Siguiendo el criterio de Odds, en nuestro estudio sólo fue encontrada 1 cepa resistente, perteneciente a la especie *C. krusei* (CMI=16  $\mu\text{g/mL}$ ), la cual había sido aislada de una muestra de esputo de un paciente de SIDA en el que no pudo ser demostrado un fallo terapéutico anterior.

En la actualidad *C. krusei* se reconoce como un patógeno importante de formas severas de candidiasis incluidos casos de fungemia después de tratamientos profilácticos con fluconazol y anfotericina B, lo que sugiere la resistencia de esta especie a los fármacos.<sup>4,9</sup>

La resistencia a la anfotericina B ha estado asociada con diversas alteraciones cualitativas y cuantitativas en la composición de esteroides (específicamente ergosterol) de la membrana celular debidas a mutaciones en algún paso de la vía metabólica del lanosterol al ergosterol, que traen como consecuencia la incorporación de precursores en la membrana celular.<sup>3,4,21</sup> Por otra parte, también se ha señalado que estas alteraciones en la membrana tienden a reducir la virulencia de la cepa y retardar la velocidad de crecimiento, lo que pudiera ser una de las causas de los pocos fallos terapéuticos a la anfotericina B.<sup>21</sup>

Uno de los factores que más puede afectar la lectura de las CMI es el tiempo de incubación. Los

períodos prolongados de incubación pueden dar lugar a la inactivación del antifúngico y, por consiguiente, se produciría una elevación de los valores de CMI o la aparición de falsa resistencia *in vitro*.<sup>15,19</sup>

Los resultados del presente estudio indican, coincidiendo con la literatura, que períodos prolongados de incubación aumentan de forma notable los valores de CMI en la mayoría de las especies en estudio, lo que se observa en la tabla 3 al incrementarse las MG y los rangos con el tiempo; los valores de MG de *C. neoformans* mostraron en apariencia poca variación entre las 24 y 72 h. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el cálculo de las MG a las 24 h se hizo basado en las cepas que habían crecido hasta ese momento (53,5 %). *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* aumentaron de forma apreciable sus valores de CMI a partir de las 24 h, lo que pudiera inducir a pensar en una posible resistencia *in vitro*. Este comportamiento no fue homogéneo para todas las cepas de una misma especie.

El 46,5 % de las cepas de *C. neoformans* no creció a las 24 h, por lo que no sería conveniente fijar un tiempo de lectura en dependencia de 1 especie. En el caso de *C. albicans*, el 95 % de las cepas había crecido a las 24 h, pero el 5 % necesitó 48 h para hacer evidente el crecimiento. Es decir, si bien es cierto que una lectura a las 24 h puede ser muy temprana para algunas cepas, para otras, 48 h puede ser un tiempo innecesariamente largo.

Además, se ha señalado por algunos autores que las cepas resistentes tienden a crecer de forma más lenta;<sup>11,21</sup> esto pudo ser comprobado en el presente trabajo, ya que la cepa que se mostró más resistente (CMI=16  $\mu\text{g/mL}$ ) tampoco había crecido a las 24 h.

Mediante el presente estudio quedó establecida la técnica para la determinación de la CMI de la anfotericina B en levaduras, la cual también puede ser aplicada para conocer la sensibilidad frente a otros antifúngicos y de esta forma queda abierta la posibilidad de establecer una vigilancia ante la aparición de cepas resistentes, y futuros estudios epidemiológicos.

## SUMMARY

In order to know the sensitivity of *Candida* and *Cryptococcus* to amphotericin B, main drug for the treatment of systemic mycosis, it was determined the minimum inhibitory concentration (MIC) in 90 clinical isolates of *Candida* and *Cryptococcus* by a micromethod for

the broth dilution. According to the results, *Cryptococcus neoformans* was more sensitive than *Candida albicans* (geometrical means 0.24 and 0.41 respectively). Only one resistant strain was found (CMI=16µg/mL), corresponding to the *Candida krusei* species. The introduction of this technique in the Mycology Laboratory of the "Pedro Kouri" Institute of Tropical Medicine will allow to establish the sensitivity patterns and to detect the possible appearance of resistance in the main species of pathogenic fungus for men in our environment.

**Subject headings:** AMPHOTERICIN B/analysis; MICROBIAL SENSITIVITY TESTS/methods; CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/isolation & purification; CANDIDA ALBICANS/isolation & purification; CULTURE MEDIA.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dupont B, Denning DW, Marriot D, Sugar A, Viviani MA, Sirisanthana T. Mycosis in AIDS patients. *J Med Vet Mycol* 1994;32(Suppl 1):65-77.
- Law D, Moore CB, Warfle HM, Ganguli LA, Keaney MG, Denning DW. High prevalence of antifungal resistance in *Candida spp.* from patients with AIDS. *J Antimicrob Chemother* 1994;34(5):659-68.
- Odds FC. *Candida* and candidiasis. 2 ed. London: Balliere Tindall, 1988:279-313.
- Conly J, Rennie R, Johnson J, Farah S, Hellman L. Disseminated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida albicans*. *J Infect Dis* 1992;165:761-4.
- Meyer RD. Current role of therapy with amphotericin B. *Clin Infect Dis* 1992;14(Suppl 1):S154-60.
- Guinet R, Chanas J, Goullier A, Bonnefoy G, Ambroise-Thomas P. Fatal septicemia due to amphotericin B-resistant *Candida lusitanae*. *J Clin Microbiol* 1983;18(2):443-4.
- De Gentile L, Bouchara JP, Cimon B, Chabase D. *Candida ciferrii*: clinical and microbiological features of an emerging pathogen. *Mycoses* 1991;34:125-8.
- Salesa R, Burgos A, Fernández-Mazarrasa C, Quindós G, Pontón J. Transient fungemia due to *Candida pelliculosa* in a patient with AIDS. *Mycoses* 1991;34:327-9.
- McQuillen DP, Zingman BA, Meunier F, Levitz SM. Invasive infections due to *C. krusei*: report of ten cases of fungemia that include three cases of endophthalmitis. *Clin Infect Dis* 1992;14:472-8.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeast: proposed standard. Document M27-P. Villanova. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992:1-22.
- Drouhet E, Dupont B, Improvisi L, Viviani MA, Tortorano AM. Disc agar diffusion and microplate automatized techniques for *in vitro* evaluation of antifungal agents on yeasts and sporulated pathogenic fungi. En: Iwata K, Vanden Bossche H, eds. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1986:31-49.
- Hernández-Molina JM, Llosa J, Martínez Brocal A, Ventosa A. *In vitro* activity of cloconazole, sulconazole, butoconazole, isoconazole, fenticonazole, and five other antifungal agents against clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida spp.* *Mycopathologia* 1992;118:15-21.
- Arias A, Arévalo MP, Andreu A, Sierra A. Sensibilidad *in vitro* de *Candida parapsilosis* frente a anfotericina B, fluconazol, itraconazol y ketoconazol. *Rev Argent Micol* 1992;15(2):15-21.
- Arévalo MP, Arias A, Andreu A, Rodríguez C, Sierra A. Sensibilidad *in vitro* de *Candida spp.* frente a la anfotericina B, fluconazol e itraconazol. *Rev Iberoamer Micol* 1994;11:40-3.
- Barchiesi, F, Colombo AL, McGough DA, Rinaldi MG. Comparative study of broth macrodilution and microdilution techniques for *in vitro* antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for clinical Laboratory Standards' proposed standard. *J Clin Microbiol* 1994;32(10):2494-500.
- Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, Bartlett MS, Body BA, Espinel-Ingroff A, et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1648-54.
- Casadevall A, Spitzer DE, Webb D, Rinaldi MG. Susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis to amphotericin B and fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1383-6.
- Polanco MA, Rodríguez-Tudela JL, Baquero F, Sánchez-Sousa A, Martínez-Suárez JV. Improved method of determining the susceptibility of *Candida albicans* to fluconazole. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:155-9.
- Carrillo-Muñoz AJ, Abarca-Salat L, Quindós G. Pruebas de estudio de sensibilidad a los antifúngicos. Factores y variables que influyen en su realización en el laboratorio. *Rev Iberoamer Micol* 1994;11:105-10.
- Martín Mazuelos E, Aller AI, Morilla D, Montero O. Antifungal activity of sertaconazole *in vitro* against clinical isolates of *Candida spp.* *Chemotherapy* 1996;42:112-7.
- Vanden BH, Warnock DW, Dupont B, Kerridge D, Sen-Gupta S, Improvisi L, et al. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. *J Med Vet Mycol* 1994;32(Suppl 1):189-202.

Recibido: 13 de agosto de 1996. Aprobado: 9 de febrero de 1997.  
Lic. Carlos M. Fernández Andreu. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.